

PATENT COOPERATION TREATY

EO/US
PCT/JP98/01217

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

01 October 1998 (01.10.98)

International application No.:

PCT/JP98/01217

Applicant's or agent's file reference:

E910-PCT

International filing date:

20 March 1998 (20.03.98)

Priority date:

21 March 1997 (21.03.97)

Applicant:

MIHARA, Masahiko

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

10 April 1998 (10.04.98)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

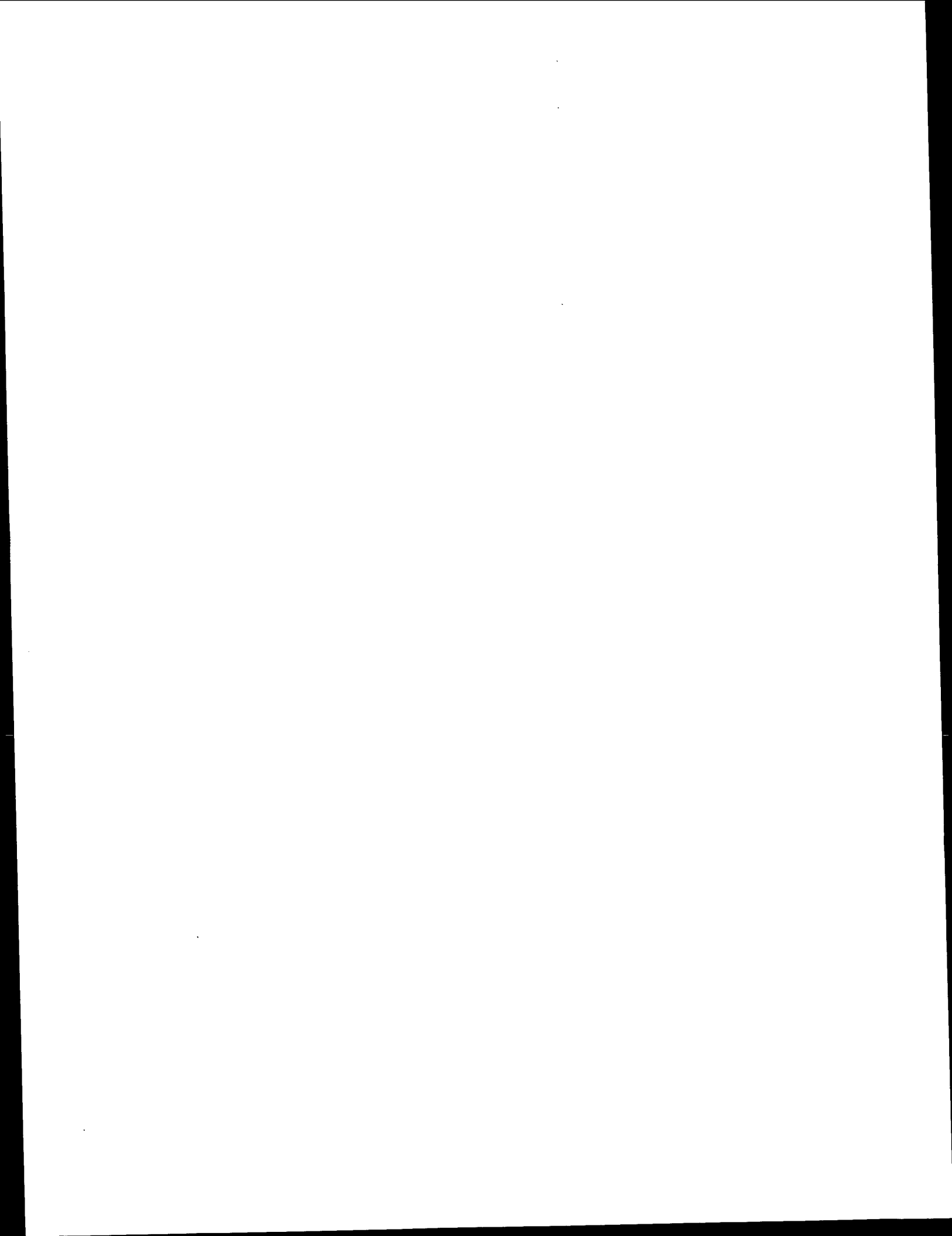
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ISHIDA, Takashi
A. Aoki & Associates
Toranomon 37 Mori Building
5-1, Toranomon 3-chome
Minato-ku
Tokyo 105-8423
JAPON

322

SEP 20 1999
PCT & TRADEMARK OFFICE

IMPORTANT NOTICE

Date of mailing (day/month/year) 01 October 1998 (01.10.98)		
Applicant's or agent's file reference E910-PCT		
International application No. PCT/JP98/01217	International filing date (day/month/year) 20 March 1998 (20.03.98)	Priority date (day/month/year) 21 March 1997 (21.03.97)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU, BR, CA, CN, EP, IL, KR, NO, PL, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AL, AM, AP, AT, AZ, BA, BB, BG, BY, CH, CU, CZ, DE, DK, EA, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NZ, OA, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
01 October 1998 (01.10.98) under No. WO 98/42377

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ISHIDA, Takashi
A. Aoki & Associates
Toranomon 37 Mori Building
5-1, Toranomon 3-chome
Minato-ku
Tokyo 105-8423
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 01 October 1998 (01.10.98)		IMPORTANT INFORMATION	
Applicant's or agent's file reference E910-PCT			
International application No. PCT/JP98/01217	International filing date (day/month/year) 20 March 1998 (20.03.98)	Priority date (day/month/year) 21 March 1997 (21.03.97)	
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al			

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, GB, IL, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US, VN

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG

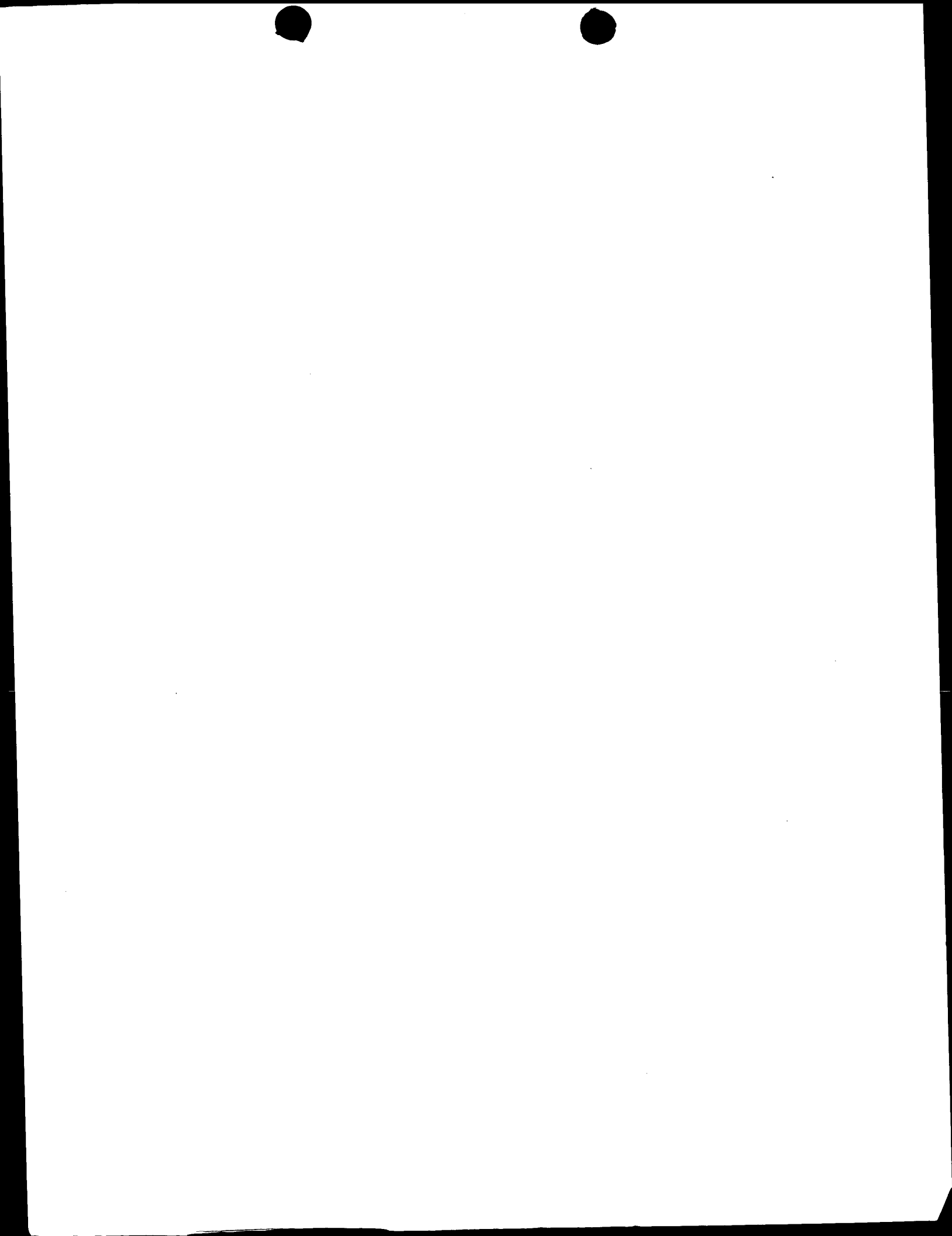
National : AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BY, CH, CU, DK, EE, ES, FI, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MW, MX, PT, SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, YU, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent including, where applicable, ES which cannot be elected since it is not bound by Chapter II.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

受理 予記入欄
国際出願番号

国際出願日

(受付印)

出願人又は代理人の書類記号
(希望する場合、最大12字)

E 9 1 0 - P C T

PCT
20.3.98
受領印

第 I 欄 発明の名称

I L - 6 アンタゴニストを有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防・治療剤

第 II 欄 出願人

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

中外製薬株式会社

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

〒115-8543 日本国東京都北区浮間5丁目5番1号

5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, TOKYO 115-8543 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

三 原 昌 彦 MIHARA Masahiko

〒412-8513 日本国静岡県御殿場市駒門1丁目135番地

中外製薬株式会社内

C/O CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

135, Komakado 1-chome, Gotenba-shi, SHIZUOKA 412-8513 JAPAN

この欄に記載した者は
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が執業に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

弁理士(7751)石 田 敬 ISHIDA Takashi

〒105-8423 日本国東京都港区虎ノ門三丁目5番1号

虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

A. AOKI & ASSOCIATES

Toranomon 37 Mori Bldg., 5-1, Toranomon 3-chome, Minato-ku,

TOKYO 105-8423 JAPAN

電話番号:

03-5470-1900

ファクシミリ番号:

03-5470-1911

加入電話番号:

J 26282

☐ 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す



100

100

100

100

第Ⅴ欄 国の指定

規則 4.9 (a) の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと: 少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

広域特許

- ☒ **AP** **ARIPO** 特許: **GH** ガーナ Ghana, **KE** ケニア Kenya, **LS** レソト Lesotho, **MW** マラウイ Malawi, **SD** スーダン Sudan, **SZ** スワジランド Swaziland, **UG** ウガンダ Uganda, **ZW** ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ **EA** **ユーラシア** 特許: **AM** アルメニア Armenia, **AZ** アゼルバイジャン Azerbaijan, **BY** ベラルーシ Belarus, **KG** キルギスタン Kyrgyzstan, **KZ** カザフスタン Kazakhstan, **MD** モルドヴァ Republic of Moldova, **RU** ロシア連邦 Russian Federation, **TJ** タジキスタン Tajikistan, **TM** トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ **EP** **ヨーロッパ** 特許: **AT** オーストリア Austria, **BE** ベルギー Belgium, **CH** and **LI** スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, **DE** ドイツ Germany, **DK** デンマーク Denmark, **ES** スペイン Spain, **FI** フィンランド Finland, **FR** フランス France, **GB** 英国 United Kingdom, **GR** ギリシャ Greece, **IE** アイルランド Ireland, **IT** イタリア Italy, **LU** ルクセンブルグ Luxembourg, **MC** モナコ Monaco, **NL** オランダ Netherlands, **PT** ポルトガル Portugal, **SE** スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ **OA** **OAPI** 特許: **BF** ブルキナ・ファソ Burkina Faso, **BJ** ベニン Benin, **CF** 中央アフリカ Central African Republic, **CG** コンゴ Congo, **CI** 象牙海岸 Côte d'Ivoire, **CM** カメルーン Cameroon, **GA** ガボン Gabon, **GN** ギニア Guinea, **ML** マリ Mali, **MR** モーリタニア Mauritania, **NE** ニジェール Niger, **SN** セネガル Senegal, **TD** チャード Chad, **TG** トーゴ Togo, 及びアフリカ知的財産条約と特許協力条約の締結国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input checked="" type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input checked="" type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴビナ Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| | <input checked="" type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> NZ ニュー・ジージーランド New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input checked="" type="checkbox"/> RU ロシア連邦 Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| | <input checked="" type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN 中国 China | <input checked="" type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input checked="" type="checkbox"/> SL シエラレオネ Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input checked="" type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input checked="" type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input checked="" type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 日本 Japan | <input checked="" type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG キルギスタン Kyrgyzstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | 以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定 (国内特許のために) するためのものである |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | <input checked="" type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC セントルシア Saint Lucia | <input checked="" type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | <input checked="" type="checkbox"/> GW ギニアビサウ Guinea-Bissau |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR リベリア Liberia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LS レソト Lesotho | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova | |

出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9 (b) の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる全ての国の指定を行う。

ただし、

の国の指定を除く。

出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15ヶ月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。 (指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15ヶ月以内に受理官庁へ提出されなければならない。)



4-1

追記欄 この追記欄を使用しないときは、明紙を明紙に含めないこと。

以下の場合にこの欄を使用する。

1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄……の続き」（欄番号を表示する）と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。；特に、

(i) 出願人及び/又は発明者として3人以上いる場合で、「続表」を使用できないとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」と表示し、第Ⅱ欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

(ii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しているとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」（このような場合があれば）と記載し、該当する出願人の氏名（名称）を表示し、（それぞれの）氏名（名称）の次にその者が出願人となる指定国（及び/又は、該当する場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許）を記載する。

(iii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」（このような場合があれば）と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国（及び/又は、該当する場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許）を記載する。

(iv) 第Ⅳ欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

(v) 第Ⅴ欄において指定国（又は、OAPI特許）が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国の「継続」又は「一部継続」を伴うとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国（又は、OAPI特許）を表示し、それぞれの指定国（又は、OAPI特許）の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(vi) 優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、第Ⅵ欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

2. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」と表示し、以下にその内容を記述する。

IV 欄の 続 き

氏 名 弁理士（8787）福 本 積 FUKUMOTO Tsumoru

氏 名 弁理士（8826）戸 田 利 雄 TODA Toshio

氏 名 弁理士（8289）西 山 雅 也 NISHIYAMA Masaya

あて名 IV欄に記載のあて名に同じ The same address as Box IV



11

第Ⅵ欄 優先権主張

この優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

下記の先の出願に基づき優先権を主張する

国名 (その国において又はその国 について先の出願がされた)	先の出願の出願日 (日. 月. 年)	先の出願の出願番号	先の出願を受理した官庁名 (広域出願又は国際出 願の場合のみ記入)
(1) 日本国 JAPAN	21. 03. 97	特願平9-68467号	
(2)			
(3)			

先の出願の認証原本が、本件国際出願の受理官庁（日本国特許庁）で発行される場合であって、優先権書類送付請求書を本件国際出願に添付するときは、次の□に
レ印を付すこと。

☐ 上記()の番号の先の出願のうち、次の()の番号のものについては、出願書類の認証原本を
作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

第Ⅶ欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択

ISA/J P

先の出願 上記国際調査機関による別の調査（国際・国際型又はその他）が既に実施又は請求されており、可能な限り当該調査の結果を今回の国際調査の基
礎とすることを請求する場合に記入する。先の調査に関連する出願（若しくはその翻訳）又は関連する調査請求を表示することにより、当該先の調査又は請求を特定
（又は広域官庁）

出願日（日. 月. 年）

出願番号

第Ⅷ欄 照合欄

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

- | | |
|----------|------|
| 1. 願書 | 4 枚 |
| 2. 明細書 | 34 枚 |
| 3. 請求の範囲 | 2 枚 |
| 4. 要約書 | 1 枚 |
| 5. 図面 | 1 枚 |
| 合計 | 42 枚 |

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- | | |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 5. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 |
| 2. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し | <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 |
| 3. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の説明書 | <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 |
| 4. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記第Ⅵ欄の
（ ）の番号を記載する） | 6. <input checked="" type="checkbox"/> 寄託した微生物に関する書面 |
| | 7. <input type="checkbox"/> スクレオチド及び/又はアミノ酸配列リスト
(フレキシブルディスク) |
| | 8. <input type="checkbox"/> その他（例えば、優先権書類送付請求書と具体的に
記載する） |

要約書とともに公表する図として 第 図 を提示する（図面がある場合）

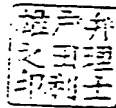
第Ⅸ欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

石田 敬



戸田 利雄



福本 積



西山 雅也



1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

受理官庁記入欄

3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された
国際調査機関

ISA/J P

6. ☐ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に
調査用写しを送付していない

2. 図面

☐ 受理された☐ 不足図面がある

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式PCT/RO/101（最終用紙）（1994年1月、再版1997年7月）



...

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO
Dr. Mary M. Smidg.
ARC Collaborative Centre,
1-3 Burtonhole Lane,
Mill Hill,
London, NW7 1AD
NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the
DEPOSITOR:

Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:

Escherichia coli DH5 α pPM-k3

NCIMB 40366

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☐ a scientific description

☒ a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,
which was received by it on 12 February 1991 (date of the original deposit)¹

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International
Depositary Authority on (date of the original deposit) and
a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty
was received by it on (date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: NCIMB Ltd.,

Signature(s) of person(s) having the power
to represent the International Depositary
Authority or of authorized official(s):

Address: 23 St Machar Drive,
Aberdeen. AB2 1RY

Date: 12 March 1991

¹ Where Rule 5.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary
authority was acquired.



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO
Dr. Mary M. Bendig,
MRC Collaborative Centre,
1-3 Burtonhole Lane,
Mill Hill,
London. NW7 1AD
NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the
DEPOSITOR:

Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:

Escherichia coli DH5 α pPM-h1

NCIMB 40362

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☐ a scientific description

☒ a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,
which was received by it on 12 February 1991 (date of the original deposit)¹

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International
Depositary Authority on (date of the original deposit) and
a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty
was received by it on (date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: NCIMB Ltd.,
Address: 23 St Machar Drive,
Aberdeen. AB2 1RY

Signature(s) of person(s) having the power
to represent the International Depositary
Authority or of authorized official(s):
Date: 12 March 1991

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of International depositary
authority was acquired.



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

中外製薬株式会社

取締役社長

永山 治

寄託者

あて名 〒 115

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

殷

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.



1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

Rat-mouse hybridoma MR16-1

(受託番号)

FERM BP- 5875

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 9 年 3 月 13 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、
そして、
年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。
日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

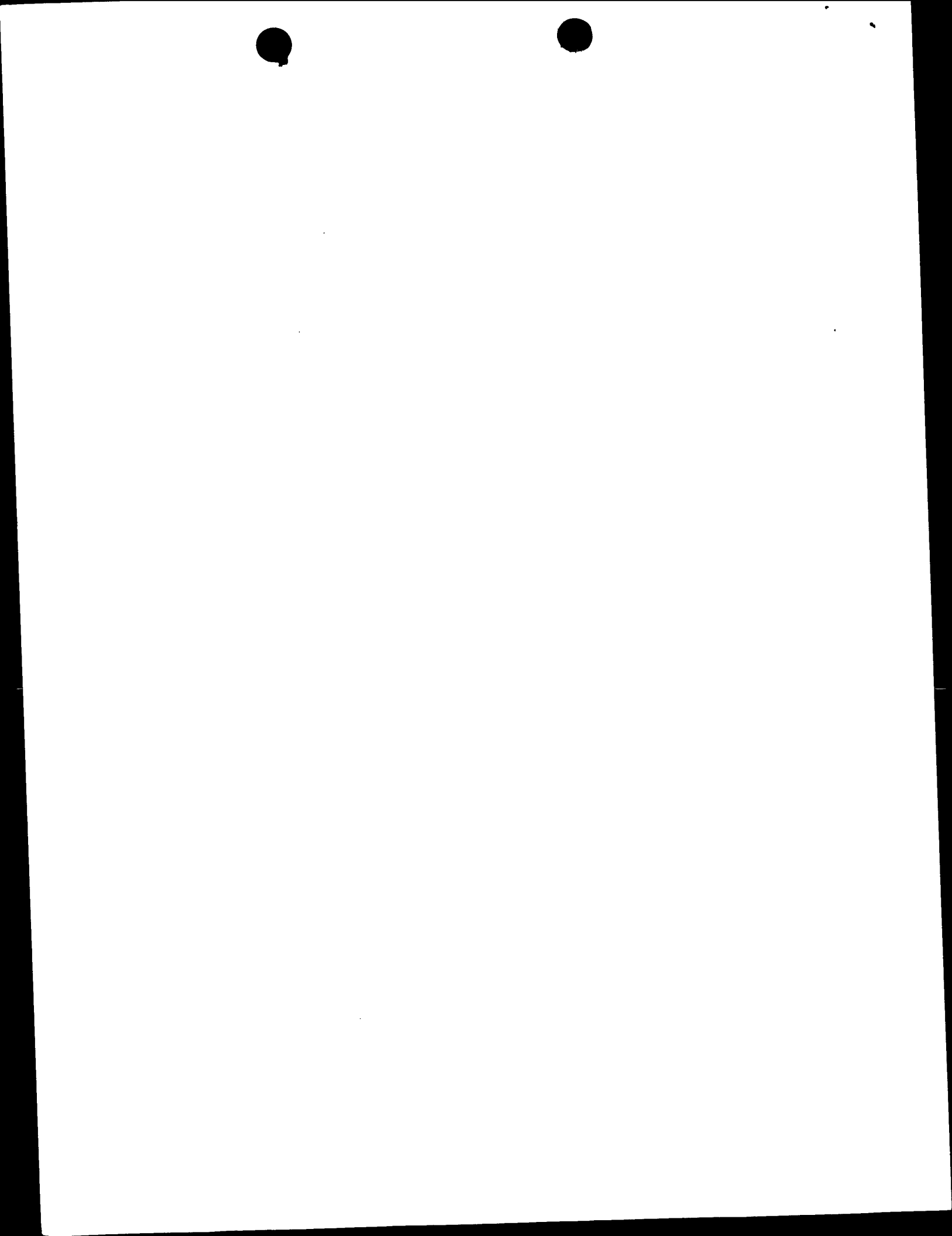
名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency for Industrial Science and Technology

所長 大石 道夫

Michio Ohsaka, D. DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)
1-3, Higashi-tokuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 9 年 (1997) 3 月 13 日



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い発行される

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

岸本 忠三

寄託者

あて名 ⑤ 584

殿

大阪府富田林市中野町 3 丁目 5 番 31 号

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

HB101-p1B1BSF2R

(受託番号)

微工研条寄第 2232 号

(FERM BP- 2232)

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☐ 科学的性質

☒ 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は 9 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。

IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称:

Agency of Research Institute Science and Technology

所長 鈴木 智

Tomoo

DIRECTOR GENERAL

あて名: 日本国茨城県

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi
305 JAPAN

便番号 3 0 5)

989) 1 月 9 日



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に關するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

岸本 定三

寄託者

あて名 ㊦ 584

設

大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

I. 微生物の表示

(寄託者が付した鑑別のための表示)

PM1

(受託番号)

微生物研究第 2998 号

(FERM BP- 2998)

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☐ 科学的性質

☒ 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 元年 7月12日 (原寄託日) に受領したI欄の微生物を受託する。

平成 元年 7月12日に寄託された微生物研究第 P- 10839 号より移管)

IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称:

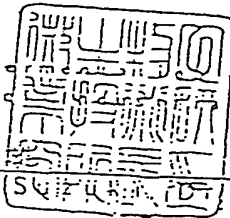
Agency

Research Institute

Science and Technology

所長 鈴木智

Tomoo



DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市夏1丁目1番3号 (郵便番号 305)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305. JAPAN

平成 2年 (1990) 7月 10日



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁 (国際予備審査機関)

出願人代理人

石田 敬

殿

PCT

あて名

〒 105-8423

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号
虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)
[PCT規則71.1]

発送日
(日.月.年)

19.01.99

出願人又は代理人
の書類記号

E910-PCT

重要な通知

国際出願番号

PCT/J P98/01217

国際出願日

(日.月.年) 20.03.98

優先日

(日.月.年) 21.03.97

出願人 (氏名又は名称)

中外製薬株式会社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告 (付属書類を除く) の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に (官庁によってはもっと遅く) 所定の手続 (翻訳文の提出及び国内手数料の支払い) をしなければならない (PCT39条(1)) (様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照)。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 C

9 4 5 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3454

様式PCT/IPEA/416 (1992年7月)

(添付用紙の注意書きを参照)



注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 22 JAN 1999

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 E910-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P98/01217	国際出願日 (日.月.年) 20.03.98	優先日 (日.月.年) 21.03.97
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁸ A61K39/395, A61K45/00		
出願人(氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☒ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 10.04.98	国際予備審査報告を作成した日 28.12.98	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 森井 隆信 電話番号 03-3581-1101 内線 3454	4C 9455



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-13

有

請求の範囲

無

進歩性(I S)

請求の範囲

11-13

有

請求の範囲

1-10

無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲

1-13

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献(1): WELDLING, Daniel et al., 'Treatment of Severe Rheumatoid Arthritis by Anti-Interleukin 6 Monoclonal Antibody.', The Journal of Rheumatology, Vol.20, No.2, (1993) pages 259 to 262

文献(2): J P, 3-291236, A (東ソー株式会社)
20. 12月. 1991 (20. 12. 91)

文献(1)には、インターロイキン-6(IL-6)アンタゴニストである抗IL-6モノクローナル抗体が、リウマチ様関節炎に有効である旨、記載がなされている。一方、文献(2)には、IL-6が関係する感作T細胞関与の疾患として、慢性関節リウマチがあげられている。したがって、文献(1)に記載されたIL-6アンタゴニストを有効成分として、上記リウマチのような感作T細胞関与疾患の予防又は治療剤とすることは、本願発明が属する技術分野における専門家が容易に想到し得るものである。また、IL-6アンタゴニストの種類については、適宜選択する程度のものに過ぎない。

したがって、本願の請求の範囲1乃至10記載の発明は、進歩性を有しない。

リウマチ以外の特定の感作T細胞関与疾患予防又は治療効果、及び、感作T細胞自体の抑制作用に基づく、請求の範囲11乃至13記載の発明については、上記文献(1)及び(2)の記載によっては、その新規性及び進歩性が否定されるものではない。



VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 97/24340, A1 (P X)	10. 07. 97	27. 12. 96	27. 12. 95

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	----------------------------------------



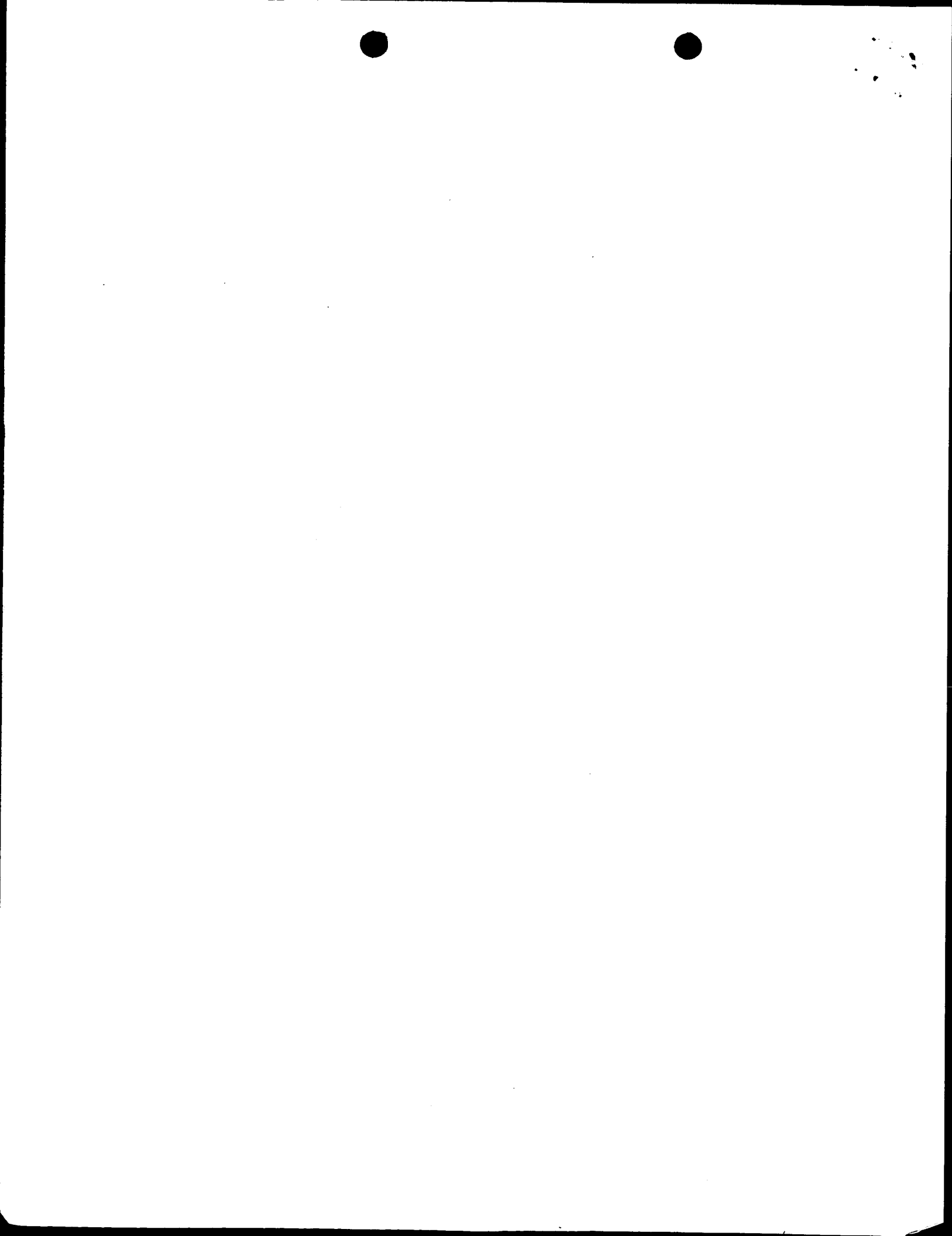


European Patent
Office

SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT

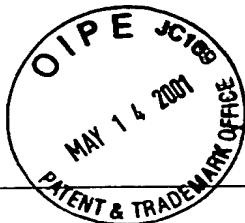
Application Number
EP 98 90 9796

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)
A	WO 96 11020 A (KISHIMOTO TADAMITSU ;MIHARA MASAHICO (JP); MORIYA YOICHIRO (JP); C) 18 April 1996 (1996-04-18)		A61K39/395 A61K45/00
P,A	& EP 0 783 893 A (KISHIMOTO TADAMITSU; CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD (JP) 16 JULY 1997)) 16 July 1997 (1997-07-16) * the whole document *	1-7, 11-15	
A	SATO K ET AL: "Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6 -dependent tumor cell growth" CANCER RESEARCH,AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD,US, vol. 53, 15 February 1993 (1993-02-15), pages 851-856, XP002119558 ISSN: 0008-5472 * the whole document *	1-4,6, 8-15	
A	US 5 210 075 A (LOBL THOMAS J ET AL) 11 May 1993 (1993-05-11) * the whole document *	1,11,12, 14,15	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6) C07K A61K
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 30 January 2001	Examiner Wagner, R
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			





P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016



Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

R.V.

HOFFMANN - EITLE
Patent- und Rechtsanwälte
Arabellastrasse 4
81925 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN

12. Feb. 2001

HOFFMANN - EITLE, MÜNCHEN
PATENTANWÄLTE RECHTSANWÄLTE

Datum/Date

12.02.01

Zeichen/Ref./Réf.

79 475 a/fi

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°.

98909796.9-2116-JP9801217

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

RECEIVED

MAY 17 2001

TECH CENTER 1600/29

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.



EP

US

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 E910-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P98/01217	国際出願日 (日.月.年) 20.03.98	優先日 (日.月.年) 21.03.97
出願人(氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

3. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願と共に提出されたもの

☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

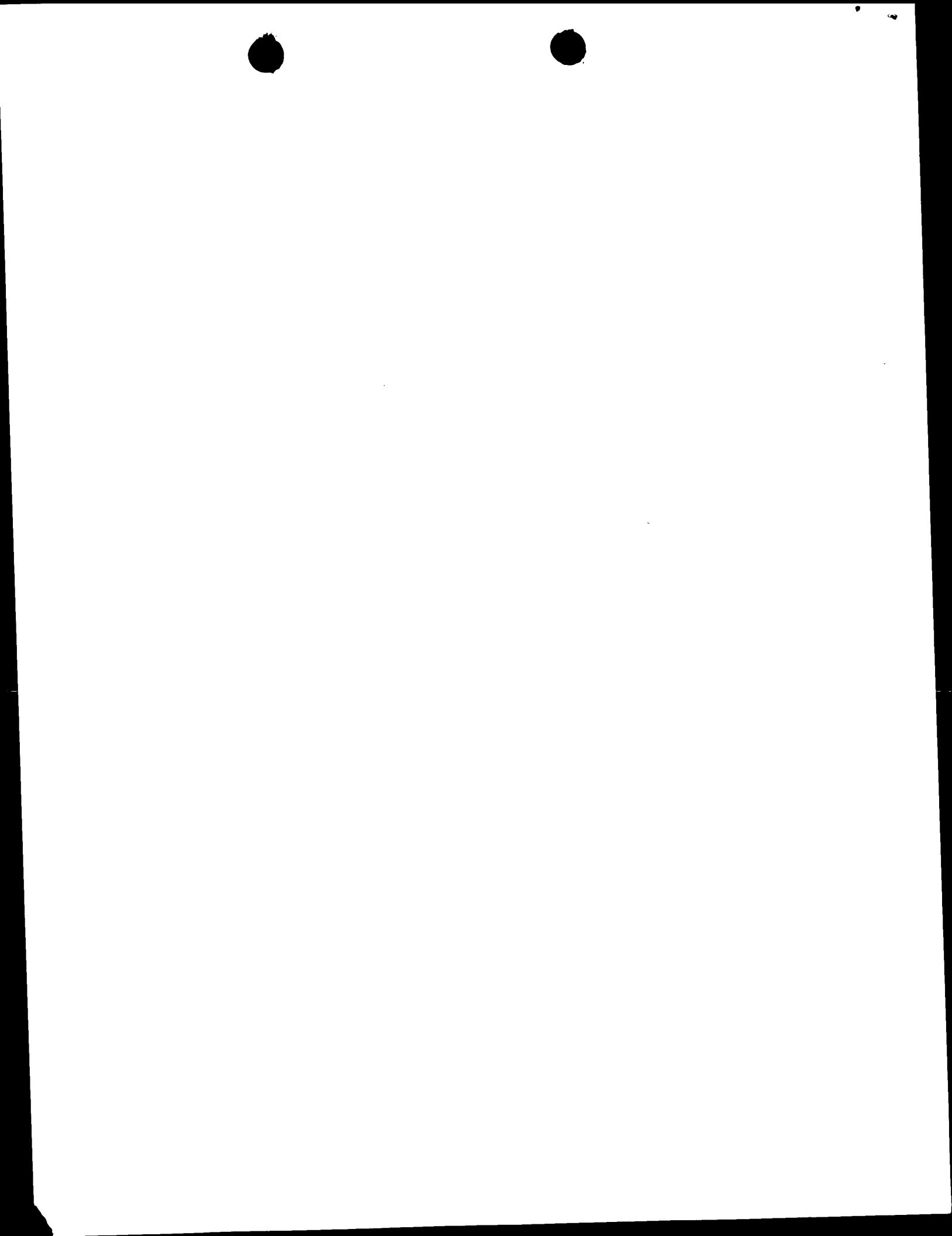
☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ A61K39/395, A61K45/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ A61K39/395, A61K45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN): IL-6, gp130, antagonist/antibody (MH166, SK2, MR16-1, PM-1, AUK12-20, AUK64-7, AUK146-15, AM64, 4B11, 2H4, B-S12, B-P8), sensitized T cell/lymphocyte, multiple sclerosis, uveitis, chronic thyroiditis, delayed hypersensitivity, delayed type allergic reaction, contact/atopic dermatitis

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/ A	WELDLING, Daniel et al., 'Treatment of Severe Rheumatoid Arthritis by Anti-Interleukin 6 Monoclonal Antibody.', The Journal of Rheumatology, Vol.20, No.2, (1993) pages 259 to 262, especially Abstract	1-10/ 11-13
Y/ A	J P, 3-291236, A (東ソー株式会社) 20.12月.1991 (20.12.91), 特に、第2頁左上欄「産業上の利用分野」, (ファミリーなし)	1-10/ 11-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.06.98

国際調査報告の発送日

16.06.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4 C

9 4 5 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3454

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GIJBELS, K. et al., 'Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation.' Molecular Medicine, Vol.1, No.7, (1995) pages 795 to 805	1-13
A	MIHARA, Masahiko et al., 'Interleukin 6 inhibits delayed-type hypersensitivity and the development of adjuvant arthritis' Eur. J. Immunol., Vol.21, No.10, (1991) pages 2327 to 2331	1-13
A	MATSUDA, Tadashi et al., 'Establishment of an interleukin 6 (IL 6) B cell stimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL 6 monoclonal antibodies.', Eur. J. Immunol., Vol.18, (1988) pages 951 to 956	1-13
P, X	WO, 97/24340, A1 (武田薬品工業株式会社) 10. 7月. 1997 (10. 07. 97) 特に、要約 & J P, 9-23576, A	1, 11



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 39/395, 45/00	A1	(11) 国際公開番号 WO98/42377 (43) 国際公開日 1998年10月1日(01.10.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01217 (22) 国際出願日 1998年3月20日(20.03.98) (30) 優先権データ 特願平9/68467 1997年3月21日(21.03.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 三原昌彦(MIHARA, Masahiko)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: PREVENTIVES OR REMEDIES FOR SENSITIZED T CELL-RELATED DISEASES CONTAINING IL-6 ANTAGONISTS AS THE ACTIVE INGREDIENT (54) 発明の名称 IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防・治療剤 (57) Abstract Preventives or remedies for sensitized T cell-related diseases, which contain as the active ingredient interleukin-6 (IL-6) antagonists such as antibodies against IL-6 receptors, antibodies against IL-6 and antibodies against gp130.		

インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニスト、例えば IL-6 受容体に対する抗体、IL-6 に対する抗体、gp130 に対する抗体等を含んで成る、感作T細胞関与疾患の予防または治療剤。

。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

明 細 書

IL-6 アンタゴニストを有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防・治療剤

技術分野

本発明はインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。また、本発明は、IL-6アンタゴニストを有効成分とする感作T細胞抑制剤に関する。さらに、本発明はIL-6受容体に対する抗体を有効成分とする感作T細胞抑制剤に関する。

背景技術

IL-6はB細胞刺激因子2 (BSF2) あるいはインターフェロン β 2とも呼称されたサイトカインである。IL-6は、Bリンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され (Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった (Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78)。IL-6は、Tリンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている (Lotz et al., J. Exp. Immunol. 18: 1253-1258, 1988)。

IL-6は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80kDのリガンド結合性蛋白質のIL-6受容体である。IL-6受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6受容体としても存在する。

もう一つは、非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約

130kD の膜蛋白質 gp130 である。IL-6 と IL-6 受容体は IL-6 / IL-6 受容体複合体を形成し、次いで gp130 と結合することにより、IL-6 の生物学的活性が細胞内に伝達される (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967)。

IL-6 アンタゴニストは、IL-6 の生物学的活性の伝達を阻害する物質であり、これまでに、IL-6 に対する抗体 (抗 IL-6 抗体)、IL-6 受容体に対する抗体 (抗 IL-6 受容体抗体)、gp130 に対する抗体 (抗 gp130 抗体) が知られている。また、その他に、国際特許出願公開番号 W0 95-00852、国際特許出願公開番号 W0 95-11303、国際特許出願公開番号 W0 96-34104、国際特許出願公開番号 W0 96-18648、国際特許出願公開番号 W0 96-17869、特開平 7-324097、特開平 8-311098 に開示された IL-6 アンタゴニストが知られている。

抗 IL-6 受容体抗体に関しては、いくつかの報告がある (Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146、Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630、国際特許出願公開番号 W0 95-09873、フランス特許出願公開番号 FR 2694767、米国特許番号 US 5 21628)。その一つであるマウス抗体 PM-1 (Hirata, et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906) の相捕性決定領域 (CDR) をヒト抗体へ移植することにより得られたヒト型化 PM-1 抗体が知られている (国際特許出願公開番号 W0 92-19759)。

一方、多くの自己免疫疾患やアレルギー疾患において、特定の抗原を認識する T 細胞 (感作 T 細胞) が存在し、この感作 T 細胞が病態に関与していることが知られている。例えば、多発性硬化症ではミエリン塩基性タンパク (Zhang, J. et al., J. Exp. Med (1994) 179, 973-984)、ぶどう膜炎では S 抗原 (Nussenblatt, R. B. et al., Am. J. Ophthalmol (1980) 89, 173-179)、慢性甲状腺炎ではサイログロブリン、アトピー性皮膚炎では食物、ダニなど (Kubota

, Y. et al., J. Dermatol (1993) 20, 85-87, Kondo, N. et al., J. Allergy Clin. Immunol (1993) 91, 658-668)、遅延型過敏症では細菌、ウイルス、カビなど、接触性皮膚炎では金属、漆などを抗原とする感作T細胞の存在が知られている。

さらに、これらの抗原を動物に免疫したり、抗原特異的感作T細胞を非免疫動物に移入することによりヒトと類似の病態を誘導することも可能である。このことから、感作T細胞が上記疾患において重要な役割を果たしていると考えられている。現在、これら疾患の治療にはステロイド剤や免疫抑制剤が使用されているが、対症療法であり、しかも長期間の投与が必要とされ、副作用が問題となっている。

これまでに、上記のようなIL-6アンタゴニストが感作T細胞抑制効果を示し、感作T細胞が関与する疾患に対して治療効果を有することは知られていなかった。

発明の開示

本発明は、前記の欠点を有さない感作T細胞関与疾患の治療剤を提供しようとするものである。

すなわち、本発明は、IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、IL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、IL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関

する。

本発明はまた、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、PM-1抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、MR16-1抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、ヒト抗体定常領域（C領域）を有するIL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、IL-6受容体に対するキメラ抗体またはヒト型化抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、ヒト型化PM-1抗体を有効成分として含有する感作T細胞関与疾患の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、上記IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する多発性硬化症、ぶどう膜炎、慢性甲状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎またはアトピー性皮膚炎の予防または治療剤に関する。

本発明はまた、IL-6アンタゴニストを有効成分とする感作T細胞抑制剤に関する。

本発明はさらに、IL-6受容体に対する抗体を有効成分とする感作T細胞抑制剤に関する。

図面の簡単な説明

図1は、結核菌感作と同時にMR16-1を投与した際の、MR16-1のマウス遅延型足せき浮腫反応抑制作用を示す。

発明の実施の形態

1. IL-6 アンタゴニスト

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストは、感作T細胞の抑制効果または、感作T細胞が関与する疾患の予防または治療効果を示すものであれば、その由来、種類および形状を問わない。

IL-6アンタゴニストは、IL-6による情報伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する物質である。IL-6アンタゴニストとしては、抗IL-6抗体、抗IL-6受容体抗体、抗gp130抗体、IL-6改変体、あるいはIL-6またはIL-6受容体の部分ペプチドが挙げられる。

1-1. 抗IL-6抗体

本発明で使用される抗IL-6抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する抗体である。

このような抗体としては、MH166 (Matsuda et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951 -956) やSK2 抗体 (Sato, K. et al., 第21回 日本免疫学会総会、学術記録(1991) 21, 166) 等が挙げられる。

1-1-1. IL-6 の調製

抗IL-6抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免

疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、抗IL-6抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6は、Eur. J. Biochem (1987) 168, 543、J. Immunol. (1988) 140, 1534、あるいはArgic. Biol. (1990) 54, 2685に開示されたIL-6遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のIL-6蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

1-2. 抗IL-6受容体抗体

本発明で使用される抗IL-6受容体抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6受容体抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6受容体と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する抗体である。

このような抗体としては、MR16-1抗体 (Saito, et al., J. Immunol. (1993) 147, 168-173)、PM-1抗体 (Hirata, et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906)、AUK12-20抗体、AUK64-7抗体あるいはAUK146-15抗体 (国際特許出願公開番号WO 92-19759)

などが挙げられる。これらのうちで、特に好ましい抗体としてPM-1抗体が挙げられる。

なお、PM-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、PM-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成2年7月10日に、FERM BP-2998としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。また、MR16-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株はRat-mouse hybridoma MR16-1として、平成9年3月13日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5875として寄託された。

1-2-1. IL-6 受容体の調製

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6受容体を感じ作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、抗IL-6受容体抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6受容体は、欧州特許出願公開番号EP 325474 に、マウスIL-6受容体は日本特許出願公開番号特開平3-155795に開示されたIL-6受容体遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6受容体蛋白質は、細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱しているもの（可溶性IL-6受容体）（Yasukawa, et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676）との二種類がある。可溶性IL-6受容体抗体は細胞膜に結合しているIL-6受容体の実質的に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6受容体と異なっている。

IL-6受容体の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当

な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のIL-6受容体蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6受容体を発現している細胞やIL-6受容体蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

ヒトIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpIBIBSF2Rを含有する大腸菌(E. coli)は、平成元年(1989年)1月9日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、HB101-pIBIBSF2Rとして、受託番号FERM BP-2232としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

1-3. 抗gp130 抗体

本発明で使用される抗gp130 抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗gp130 抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はgp130 と結合することにより、IL-6/IL-6受容体複合体のgp130 への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する抗体である。

このような抗体としては、AM64抗体(特開平3-219894)、4B11抗体および2H4 抗体(US5571513) B-S12 抗体およびB-P8抗体(特開平8-291199)などが挙げられる。

1-3-1. gp130の調製

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、gp130 を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、

得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用される gp130 は、欧州特許出願公開番号 EP 411946 に開示された IL-6 受容体遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

gp130 の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的の gp130 蛋白質を公知の方法で精製し、この精製 IL-6 受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、gp130 を発現している細胞や gp130 蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

1-4. 抗体産生ハイブリドーマの作製

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に 4-21 日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確

認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550)、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8: 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133) 等が適宜使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養

に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG 溶液、例えば、平均分子量1000～6000程度のPEG 溶液を通常、30～60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原蛋白質または抗原発現細胞で感作し、感作Bリンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、所望の抗原または抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原または抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735 参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブ

リドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

例えば、抗IL-6受容体抗体産生ハイブリドーマの作製は、特開平3-139293に開示された方法により行うことができる。工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成2年7月10日に、FERM BP-2998としてブタペスト条約に基づき国際寄託されたPM-1抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウス（日本クレア製）の腹腔内に注入して腹水を得、この腹水からPM-1抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5% BM-Condimed H1（Boehringer Mannheim 製）含有 RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM培地（GIBCO-BRL 製）、PFHM-II培地（GIBCO-BRL 製）等で培養し、その培養上清からPM-1抗体を精製する方法で行うことができる。

1-5. 組換え型抗体

本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, TERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

具体的には、目的とする抗体を産生するハイブリドーマから、抗

体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry（1979）18, 5294-5299）、AGPC法（Chmczynski, P. ら、（1987）162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia 製）等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia 製）を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1988）85, 8998-9002；Belyavsky, A. ら、Nucleic Acids Res.（1989）17, 2919-2932）を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。

本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる

。

1-6. 改変抗体

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNA Aをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

例えば、キメラPM-1抗体のL鎖およびH鎖のV領域をコードするDNAを含むプラスミドは、各々pPM-k3およびpPM-h1と命名され、このプラスミドを有する大腸菌は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limitedに、1991年2月11日に、各々NCIMB 40366、NCIMB40362としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（国際特許出願公開番号WO 92-19759参照）。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（FR; framework region）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオ

リボヌクレオチドからPCR 法により合成する。得られたDNA をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照）。

CDR を介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C 領域が使用される。ヒト抗体C 領域としては、C γ が挙げられ、例えば、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4 を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C 領域を修飾してもよい。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC 領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域（framework region; FR）およびC 領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化PM-1抗体が挙げられる（国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照）。

1-7. 発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なブ

ロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリA シグナルを機能的に結合させたDNA あるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bact

eriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、W096/30394を参照)。

複製起源としては、SV 40、ポリオマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 が知られている。植物細胞としては、Nicotiana tabacum 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばアスペルギウス属 (Aspergillus) 属、例えばアスペルギウス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、in vivoにて抗体を産生してもよい。

一方、in vivoの産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる（Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993）。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。

植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。（Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュ

ロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば *Nicotiana tabacum* に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

上述のように *in vitro* または *in vivo* の産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H 鎖) または軽鎖 (L 鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいは H 鎖および L 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照)。

1-8. 抗体修飾物

本発明で使用する抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv または H 鎖と L 鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Plueckthun, A. & Skerratt, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 65

2-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照)。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリッカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリッカーとしては、例えばアミノ酸12～19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリッカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

また、一旦scFvをコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本願特許請求の範囲

でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

1-9. 抗体の分離・精製

1-9-1. 抗体の分離・精製

前記のように発現・産生された抗体は、宿主細胞内外から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインA カラム、プロテインG カラムが挙げられる。プロテインA カラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、PORO S、Sephacrose F.F.等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLCに適用可能である。または逆相HPLCを使用することもできる。

1-9-2. 抗体の濃度測定

上記2-1 で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定またはELISA等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、をPBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M 重炭酸緩衝液 (pH

9.6) で1 $\mu\text{g/ml}$ に希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAGO製) 100 μl を96穴プレート (Nunc製) に加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベーションし、抗体を固着化する。

ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用する抗体または抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL製) 100 μl を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100 μl を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

1-10. 抗体以外のIL-6アンタゴニスト

本発明で使用するIL-6改変体は、IL-6受容体との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6改変体はIL-6受容体に対しIL-6と競合的に結合するが、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

IL-6改変体は、IL-6のアミノ酸配列のアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。IL-6改変体のもととなるIL-6はその由来を問わないが、抗原性等を考慮すれば、好ましくはヒトIL-6である。具体的には、IL-6のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56)を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適切な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒトIL-6遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、IL-6改変体をコードする

遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じてIL-6改変体を得ることができる。

IL-6改変体の具体例としては、Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93、及びSavino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, W096-18648, W096-17869 に開示されている。

本発明で使用されるIL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、各々IL-6受容体あるいはIL-6との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドはIL-6受容体又はIL-6に結合し、これらを捕捉することによりIL-6のIL-6受容体への結合を特異的に阻害する。その結果、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列においてIL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域の一部又は全部のアミノ酸配列からなるペプチドである。このようなペプチドは、通常10～80、好ましくは20～50、より好ましくは20～40個のアミノ酸残基からなる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列において、IL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域を特定し、その一部又は全部のアミノ酸配列を通常知られる方法、例えば遺伝子工学的手法又はペプチド合成法により作製することができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドを遺伝子工学的手法により作製するには、所望のペプチドをコードするDNA配列を発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じて得ることができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドをペプチド合成法により作製するには、ペプチド合成において通常用いられている方法、例えば固相合成法又は液相合成法を用いることができる。具体的には、続医薬品の開発第14巻ペプチド合成 監修矢島治明廣川書店1991年に記載の方法に準じて行えばよい。固相合成法としては、例えば有機溶媒に不溶性である支持体に合成しようとするペプチドのC末端に対応するアミノ酸を結合させ、 α -アミノ基及び側鎖官能基を適切な保護基で保護したアミノ酸をC末端からN末端方向の順番に1アミノ酸ずつ縮合させる反応と樹脂上に結合したアミノ酸又はペプチドの α -アミノ基の該保護基を脱離させる反応を交互に繰り返すことにより、ペプチド鎖を伸長させる方法が用いられる。固相ペプチド合成法は、用いられる保護基の種類によりBoc法とFmoc法に大別される。

このようにして目的とするペプチドを合成した後、脱保護反応及びペプチド鎖の支持体から切断する。ペプチド鎖との切断反応には、Boc法ではフッ化水素又はトリフルオロメタンスルホン酸を、又Fmoc法ではTFAを通常用いることができる。Boc法では、例えばフッ化水素中で上記保護ペプチド樹脂をアニソール存在下で処理する。次いで、保護基の脱離と支持体から切断しペプチドを回収する。これを凍結乾燥することにより、粗ペプチドが得られる。一方、Fmoc法では、例えばTFA中で上記と同様の操作で脱保護反応及びペプチド鎖の支持体から切断反応を行うことができる。

得られた粗ペプチドは、HPLCに適用することにより分離、精製することができる。その溶出にあたり、蛋白質の精製に通常用いられる水-アセトニトリル系溶媒を使用して最適条件下で行えばよい。得られたクロマトグラフィーのプロファイルのピークに該当する画分を分取し、これを凍結乾燥する。このようにして精製したペプチ

ド画分について、マスペクトル分析による分子量解析、アミノ酸組成分析、又はアミノ酸配列解析等により同定する。

IL-6部分ペプチド及びIL-6受容体部分ペプチドの具体例は、特開平2-188600、特開平7-324097、特開平8-311098及び米国特許公報US 5210075に開示されている。

2. IL-6アンタゴニストの活性の確認

本発明で使用するIL-6アンタゴニストの活性の評価は、通常知られた方法を使用することができる。例えば、IL-6依存性細胞MH60.BSF2にIL-6を添加し、IL-6アンタゴニストを共存させることによりIL-6依存性細胞の³H-チミジン取込みを指標として評価すればよい。また、IL-6受容体発現細胞であるU266に対し¹²⁵I標識IL-6と過剰量の非標識IL-6を添加し、同時にIL-6アンタゴニストを加え、IL-6受容体発現細胞に結合した¹²⁵I標識IL-6を測定することにより、評価すればよい。

3. 治療効果の確認

本発明により達成される効果を確認するには、本発明で 사용되는IL-6アンタゴニストを、抗原投与などでT細胞が感作された状態の動物や感作T細胞を移入した動物に投与し、感作T細胞の抑制効果を評価することにより行うことができる。

動物に投与される感作抗原としては、例えば、結核菌を用いることができる。

また、免疫される動物としては、通常実験に用いられる動物でよく、例えば、マウス、ラット、ウサギなどを用いることができる。評価する本発明の効果の確認は、抗原免疫した動物に同一の抗原をチャレンジすることにより誘導される遅延型の炎症反応を観察することにより行うことができる。

後述の実施例に示されるように、抗IL-6受容体抗体の投与により

、マウス遅延型足せき浮腫反応において、遅延型炎症反応の抑制が認められた。遅延型足せき浮腫反応には感作T細胞が関与していることが知られていることから、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストは感作T細胞に対して抑制効果を有することが示された。

4. 投与経路および製剤

本発明の感作T細胞関与疾患の予防または治療剤は、非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができる。患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 kgあたり0.01 mg から100 mg の範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1 ～1000 mg 、好ましくは5 ～50 mg の投与量を選ぶことができる。

本発明の感作T細胞関与疾患の予防または治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。

使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

本発明の予防または治療対象疾患は、感作T細胞が関与する疾患である。具体的には、遅延性過敏症、慢性甲状腺炎、ぶどう膜炎、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎または多発性硬化症等が挙げられる。本発明の予防または治療剤は、これら感作T細胞が関与する疾患の予防または治療剤として有用である。

実施例

以下、実施例、参考例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1. 遅延型足せき反応抑制作用

フロイントの不完全アジュバントにミコバクテリウム・ブチリカム (*Mycobacterium butyricum*) の乾燥死菌を2.5 mg/ml となるように加えて乳剤とした後、C57BL/6 系雌性マウスにその0.2 mlを皮下注射して抗原感作を行った。14日後に生理的食塩水に懸濁した10 mg のミコバクテリウム・ブチリカム (*Mycobacterium butyricum*) の乾燥死菌を、右側フットパッド (foot pad) に皮下注射して反応を惹起した。24時間後に左右のフットパッド (foot pad) 重量を測定し、重量の差を反応の強さとした。

MR16-1抗体は抗原感作と同時に1回のみ0.125 mg、0.5 mgあるいは2 mgを腹腔内投与した。コントロール群にはイソタイプが同じであるラットIgG (KH-5) を、また、感作しなかったマウス群には生理的食塩水を同様に投与した。その結果は図1に示す通りである。

抗原感作日に1回MR16-1を投与することにより、遅延型足せき浮腫反応は用量依存的に抑制された。

参考例 1. ヒト可溶性IL-6受容体の調製

Yamasakiらの方法 (Science (1988) 241, 825-828) に従い得られたIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpBSF2R.236を用

いて、PCR 法により可溶性IL-6受容体を作成した。プラスミドpBSF 2R.236を制限酵素Sph I で消化して、IL-6受容体cDNAを得、これをmp18 (Amersham製) に挿入した。IL-6受容体cDNAにストップコドンを導入するようにデザインした合成オリゴプライマーを用いて、インビトロミュータジェネシスシステム (Amersham製) により、PCR 法でIL-6受容体cDNAに変異を導入した。この操作によりストップコドンがアミノ酸345 の位置に導入され、可溶性IL-6受容体をコードするcDNAが得られた。

可溶性IL-6受容体cDNAをCHO 細胞で発現するために、プラスミドpSV (Pharmacia 製) と連結させ、プラスミドpSVL344 を得た。dhfrのcDNAを含むプラスミドpECEdhfrにHind III-Sal Iで切断した可溶性IL-6受容体cDNAを挿入し、CHO 細胞発現プラスミドpECEdhfr344 を得た。

10 μ g のプラスミドpECEdhfr344 をdhfr-CHO細胞株DXB-11 (Urland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) へカルシウムフォスフェイト沈降法 (Chen et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751) により、トランスフェクトした。トランスフェクトしたCHO 細胞を1mM グルタミン、10% 透析FCS、100U/ml のペニシリンおよび100 μ /ml のストレプトマイシンを含むヌクレオシド不含 α MEM 選択培養液で3 週間培養した。

選択されたCHO 細胞を限界希釈法でスクリーニングし、単一のCHO 細胞クローンを得た。このCHO 細胞クローンを20nM-200nMの濃度のメトトレキセート (MTX) で増幅し、ヒト可溶性IL-6受容体産生CHO 細胞株5E27を得た。CHO 細胞株5E27を5%FBS を含むイスコーブ改変ダルベコ培養液 (IMDM、Gibco 製) で培養した。培養上清を回収し、培養上清中の可溶性IL-6受容体の濃度をELISA にて測定した。

参考例2. ヒト抗IL-6抗体の調製

10 μ g の組換え型IL-6 (Hiranoら、Immunol. Lett., 17:41, 1988) をフロイント完全アジュバントとともにBALB/cマウス免疫し、血清中に抗IL-6抗体が検出できるまで一週間毎にこれを続けた。局所のリンパ節から免疫細胞を摘出し、ポリエチレングリコール1500を用いてミエローマ細胞株P3U1と融合させた。ハイブリドーマをHAT培養液を用いるOiらの方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) に従って選択し、ヒトIL-6抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

ヒト抗IL-6抗体を産生するハイブリドーマは下記のようにしてIL-6結合アッセイをおこなった。すなわち、柔軟なポリビニル製の96穴マイクロプレート (Dynatech Laboratories, Inc. 製, Alexandria, VA) を0.1Mのcarbonate-hydrogen carbonate緩衝液 (pH 9.6) 中で100 μ l のヤギ抗マウスIg (10 μ l/ml, Cooper Biomedical, Inc製 Malvern, PA) により4 $^{\circ}$ Cで一晩コートした。次いで、プレートを100 μ l の1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSにより室温で2時間処理した。

これをPBSで洗浄した後、100 μ l のハイブリドーマ培養上清を各穴へ加え、4 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートした。プレートを洗浄して、2000cpm/0.5ng/wellとなるように 125 I標識組換え型IL-6を各穴へ添加し、洗浄した後各穴の放射活性をガンマカウンター (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) で測定した。216個のハイブリドーマクローンのうち32個のハイブリドーマクローンがIL-6結合アッセイにより陽性であった。これらのクローンのなかで最終的に安定なMH166.BSF2が得られた。該ハイブリドーマが産生する抗IL-6抗体MH166はIgG1 κ 型のサブタイプを有する。

ついで、IL-6依存性マウスハイブリドーマクローンMH166.BSF2を

用いてMH166 によるハイブリドーマの増殖に関する中和活性を調べた。MH166.BSF2細胞を $1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$ /穴となるように分注し、これにMH166 抗体を含むサンプルを加え、48時間培養し、 $15.1\text{Ci}/\text{mM}$ の ^3H チミジン (New England Nuclear, Boston, MA) を加えた後、更に6 時間培養を続けた。細胞をグラスフィルターペーパー上におき、自動ハーベスター (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan) で処理した。コントロールとしてウサギ抗IL-6抗体を用いた。

その結果、MH166 抗体はIL-6により誘導されるMH166.BSF2細胞の ^3H チミジンの取込みを容量依存的に阻害した。このことより、MH166 抗体はIL-6の活性を中和することが明らかとなった。

参考例3. ヒト抗IL-6受容体抗体の調製

Hirataらの方法 (J. Immunol., 143:2900-2906, 1989) により作成した抗IL-6抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース4B (Pharmacia Fine Chemicals製, Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6レセプター (Science (1988) 241, 825-828) を精製した。ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン (Wako Chemicals製), 10mMトリエタノールアミン (pH 7.8) および0.15 M NaClを含む1mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオリドハイドロクロリド (Wako Chemicals製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6 回洗浄し、免疫するための部分精製IL-6受容体とした。

BALB/cマウスを 3×10^9 個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6受容体で10日おきに4 回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性穴からのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6受容体への結合活性を調べた。 5×10^7 個のU266細胞を ^{35}S -メチオニン (2.5mCi) で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可

溶化した。可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mlのジギトニン緩衝液（pH3.4）により³⁵S-メチオニン標識IL-6受容体を流出させ、0.025mlの1M Tris（pH 7.4）で中和した。

0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein G セファロース（Pharmacia 製）と混合した。洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005mlの³⁵S 標識IL-6受容体溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6受容体と反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1を樹立した。ハイブリドーマPM-1から産生される抗体は、IgG1 κ 型のサブタイプを有する。

ハイブリドーマPM-1が産生する抗体のヒトIL-6受容体に対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。ヒト組換え型IL-6を大腸菌より調製し（Hiranoら, Immunol. Lett., 17:41, 1988）、ボルトン-ハンター試薬（New England Nuclear, Boston, MA）により¹²⁵I 標識した（Taga, T et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967）。 4×10^5 個のU266細胞を100倍量の過剰な非標識IL-6の存在下で室温にて、1時間、70%（v/v）のハイブリドーマPM-1の培養上清を14000cpmの¹²⁵I 標識IL-6とともに培養した。70 μ lのサンプルを400 μ lのマイクロフュージポリエチレンチューブに300 μ lのFCS上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。

その結果、ハイブリドーマPM-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

参考例4. マウス抗IL-6受容体抗体の調製

Saito, et al., J. Immunol. (1993) 147, 168-173に記載の方法

により、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を調製した。

マウス可溶性IL-6受容体を産生するCHO細胞を10%FCSを含むIMDM培養液で培養し、その培養上清からマウス可溶性IL-6受容体RS12（上記Saito, et al参照）とAffigel 10ゲル（Biorad）に固定したアフィニティーカラムを用いてマウス可溶性IL-6受容体を精製した。

得られたマウス可溶性IL-6受容体50 μ gをフロイント完全アジュバンドと混合し、ウィスターラット（日本チャルズリバー）の腹部に注射した。2週間後からはフロイント不完全アジュバンドで追加免疫した。45日目にラットを屠殺し、その脾細胞約 2×10^8 個を 1×10^7 個のマウスミエローマ細胞P3U1と50%のPEG1500（ベーリンガーマンハイム）をもちいて常法により細胞融合させた後、HAT培地にてハイブリドーマをスクリーニングした。

ウサギ抗ラットIgG抗体（カッペル）をコートしたプレートにハイブリドーマ培養上清を加えた後、マウス可溶性IL-6受容体を反応させた。次いで、ウサギ抗マウスIL-6受容体抗体およびアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギIgGによるELISA方によりマウス可溶性IL-6受容体に対する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。抗体の産生が確認されたハイブリドーマクローンは2回のサブスクリーニングを行い、単一のハイブリドーマクローンを得た。このクローンをMR16-1と名付けた。

このハイブリドーマが産生する抗体のマウスIL-6の情報伝達における中和活性をMH60.BSF2細胞（Matsuda et al., J. immunol. (1988) 18, 951-956）を用いた ^3H チミジンの取込みで調べた。96ウェルプレートにMH60.BSF2細胞を 1×10^4 個/200 μ l/ウェルとなるように調製した。このプレートに10pg/mlのマウスIL-6とMR16-1抗体またはRS12抗体を12.3~1000ng/mlを加えて37℃、5% CO₂で44時間

培養した後、1 μ Ci/ ウェルの³Hチミジンを加えた。4 時間後に³Hチミジンの取込みを測定した。その結果MR16-1抗体はMH60.BSF2 細胞の³Hチミジン取込みを抑制した。

したがって、ハイブリドーマMR16-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

産業上の利用可能性

本発明により、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストが感作T細胞の抑制効果を有することが示された。したがって、IL-6アンタゴニストは多発性硬化症、ぶどう膜炎、慢性甲状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎またはアトピー性皮膚炎の治療剤として有用であることが明らかにされた。

特許協力条約第13規則の2の寄託された微生物への言及及び寄託機関

寄託機関 名 称：工業技術院生命工学工業技術研究所
あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1-3

微生物(1) 表 示：Rat-mouse hybridoma MR16-1

寄託番号：FERM BP-5875

寄託日：1997年3月13日

(2) 表 示：HB 101-pIBIBSF2R

寄託番号：FERM BP-2232

寄託日：1989年1月9日

(3) 表 示：PM1

寄託番号：FERM BP-2998

寄託日：1989年7月12日

寄託機関 名 称：National Collection of Industrial and
Marine Bacteria Limited

あて名 : 23 st Machar Drive Aberdeen AB2 1RY

微生物(4) 表 示 : Escherichia coli DH5 α -pPM-k3

寄託番号 : NCIMB 40366

寄託日 : 1991年 2 月12日

(5) 表 示 : Escherichia coli DH5 α -pPM-h1

寄託番号 : NCIMB 40362

寄託日 : 1991年 2 月12日

請 求 の 範 囲

1. インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する感作T 細胞関与疾患の予防または治療剤。

2. IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体であることを特徴とする請求項1 記載の予防または治療剤。

3. IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項2 に記載の予防または治療剤。

4. IL-6アンタゴニストがヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3 に記載の予防または治療剤。

5. IL-6アンタゴニストがマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3 に記載の予防または治療剤。

6. IL-6アンタゴニストがPM-1抗体であることを特徴とする請求項4 に記載の予防または治療剤。

7. IL-6アンタゴニストがMR16-1抗体であることを特徴とする請求項5 に記載の予防または治療剤。

8. IL-6アンタゴニストがヒト抗体定常領域を有するIL-6受容体に対する抗体であることを特徴とする請求項4 に記載の予防または治療剤。

9. IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対するキメラ抗体またはヒト型化抗体であることを特徴とする請求項4 に記載の予防または治療剤。

10. IL-6アンタゴニストがヒト型化PM-1抗体であることを特徴とする請求項9 に記載の予防または治療剤。

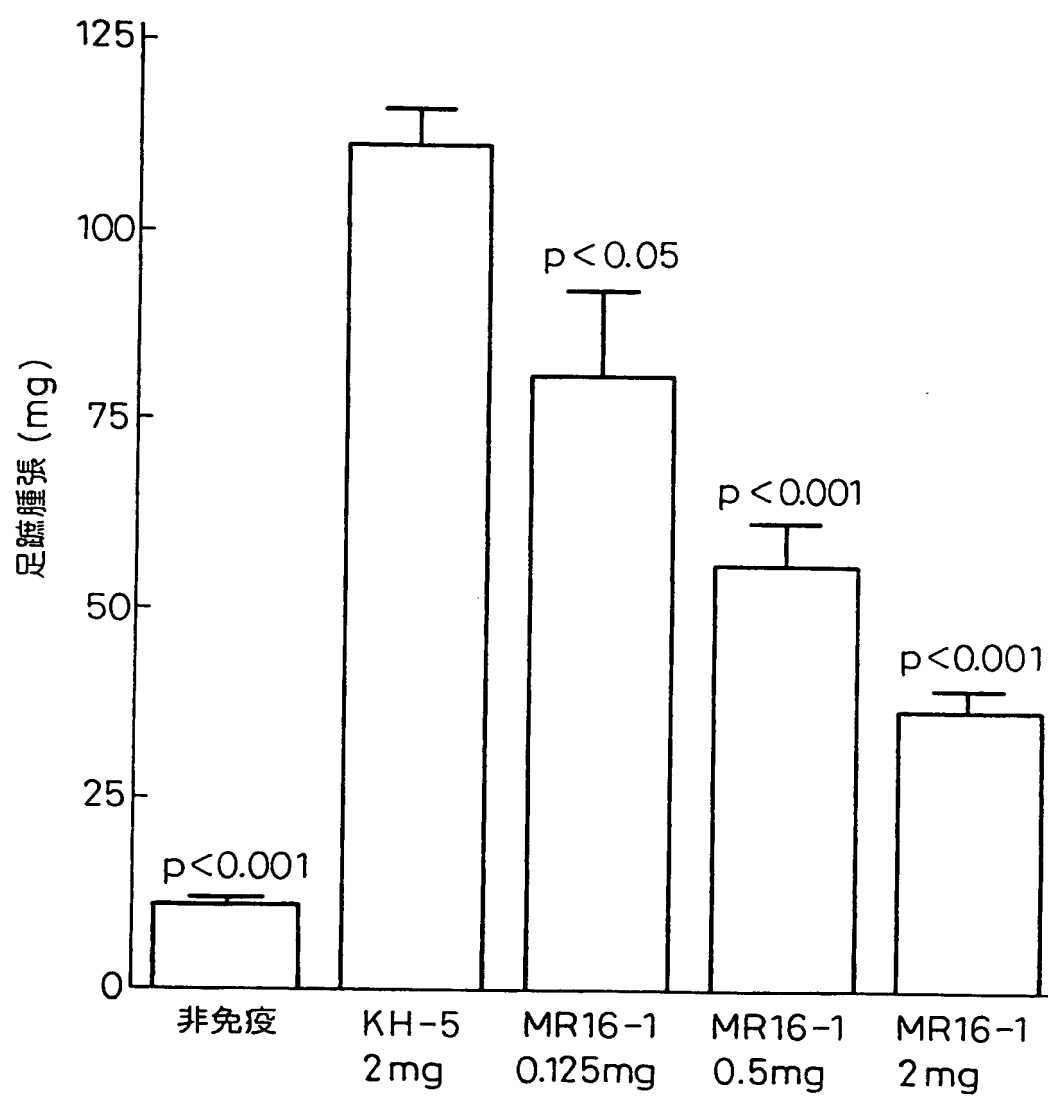
11. 感作T 細胞関与疾患が、多発性硬化症、ぶどう膜炎、慢性甲

状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎またはアトピー性皮膚炎である、請求項1 ないし10に記載の予防または治療剤。

12. IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する感作T 細胞抑制剤。

13. IL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する感作T 細胞抑制剤。

Fig.1





6.

7.

8.

9.